

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Anita Spajić

**UTJECAJ RANIJE ZAUSTAVLJENE ALKOHOLNE FERMENTACIJE NA
AROMATSKI PROFIL I BOJU VINA SORTE GRAŠEVINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija vina
Tema rada je prihvaćena na III. Izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 3.srpnja 2017.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Anita Pihler*

Utjecaj ranije zaustavljene alkoholne fermentacije na aromatski profil i boju vina sorte Graševina *Anita Spajić, 369-DI*

Sažetak: Vino je alkoholno piće svojstvene arome i boje, dobiveno procesom fermentacije soka, najčešće od grožđa, pod utjecajem kvasaca i bez prisutnosti kisika. Jedna od glavnih karakteristika koja određuje kakvoću vina i ima vrlo važnu ulogu prilikom odabira vina od strane potrošača je aroma. Ona potječe dijelom iz sirovine, alkoholne fermentacije, a dio nastaje odležavanjem i njegovanjem mladog vina. Uz bistroću i živost vina, boja je najznačajniji dojam koji primamo osjetom vida. Boju vinu (bijelom, ružičastom i crnom) daju sastojci koji se skupnim imenom označuju kao tvari boje. Boje variraju ovisno o sorti, tehnološkom postupku zrenja grožđa i preradbe, te o vremenu odležavanja (zrenja, starenja) vina. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sadržaj aromatičnih spojeva, polifenola te antioksidacijsku aktivnost u vinima sorte Graševina dobivenim različitim tehnološkim postupkom proizvodnje. Utvrđeno je da tehnološki postupak proizvodnje utječe na sadržaj aromatičnih spojeva, polifenola i na antioksidacijsku aktivnost u vinu. Rezultati analize vina pokazali su da je vino dobiveno ranije prekinutom fermentacijom imalo veći sadržaj alkohola i veći sadržaj tvari arome koje potječu iz sirovine, grožđa. Također, vino proizvedeno potpunom fermentacijom imalo je veći sadržaj polifenola te antioksidacijsku aktivnost.

Ključne riječi: Vino, fermentacija, aroma, boja

Rad sadrži: 56 stranica
18 slika
4 tablice
27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i>	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. <i>Anita Pihler</i>	član-mentor
3. prof. dr. sc. <i>Nela Nedić Tiban</i>	član
4. izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i>	zamjena člana

Datum obrane: 6. listopada 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Wine technology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its Extra ordinary session no. III. held on July 3, 2017
Mentor: *Anita Pichler*, PhD associate prof.

Influence of the previously discontinued alcoholic fermentation on the aromatic profile and the color of Graševina wine
Anita Spajić, 369-DI

Summary: Wine is an alcoholic drink with characteristic aroma and color, obtained by the process of fermentation of juice, most often grape juice, under the influence of yeasts and without the presence of oxygen. One of the main properties that determines the quality of wine and plays a very important role when selecting wine by the consumer is the aroma. It comes partially from a raw material, alcoholic fermentation, and part of it is formed by the aging and nurturing of young wine. Along the clarity and vividness of the wine, the color is the most significant impression we receive by the feeling of sight. The color of the wine (white, rose and red) originates from the ingredients that are labeled as the color compounds. The color varies depending on the variety, the technological process of grape ripening and grape processing, and the aging time (nurturing, degrading) of wines. The aim of this study was to determine the content of aroma compounds, polyphenols and antioxidant activity in Graševina wine obtained through different technological processes. It has been established that the technological process of production influences the content of aroma compounds, polyphenols and antioxidant activity in wine. The results of the wine analysis showed that the wine obtained by the previously discontinued fermentation had a higher content of alcohol and higher content of aroma compounds from the raw material, grapes. Also, wine produced by complete fermentation had a higher content of polyphenols and antioxidant activity.

Keywords: wine, fermentation, aroma, color

Thesis contains: 56 pages
18 figures
4 tables
27 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. <i>Mirela Kopjar</i> PhD, full prof.	chair person
2. <i>Anita Pichler</i> PhD, associate prof.	supervisor
3. <i>Nela Nedić Tiban</i> PhD full prof.	member
4. <i>Natalija Velić</i> PhD, associate prof.	stand-in

Defense date: October 6, 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology
Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek

Želim zahvaliti svojoj obitelji na velikoj podršci koju su mi pružali tijekom svih godina studiranja. Uvijek su bili uz mene i vjerovali u moj uspjeh. Također želim zahvaliti svim svojim prijateljima koji su mi uljepšali sve ove godine studiranja i omogućili da mi studentski dani ostanu u lijepom sjećanju.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Pichler za veliku pomoć i strpljenje pri izradi diplomskog rada.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. GROŽĐE	4
2.1.1. Podrijetlo i botanička svojstva vinove loze	4
2.1.2. Mehanička i kemijska svojstva	6
2.2. VINO	7
2.2.1. Definicija i podjela vina	7
2.2.2. Sorte grožđa za proizvodnju vina	8
2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA	10
2.3.1. Alkoholi	10
2.3.2. Ugljikohidrati	10
2.3.3. Kiseline	11
2.3.4. Aldehidi i ketoni	11
2.3.5. Esteri	12
2.3.6. Tvari arome	12
2.3.7. Enzimi	12
2.3.8. Fenolni spojevi	13
2.3.9. Mineralne tvari (pepeo)	14
2.3.10. Ekstrakt vina	14
2.3.11. Dušične tvari	15
2.3.12. Koloidi vina	15
2.3.13. Proteini	15
2.4. PROIZVODNJA VINA	16
2.4.1. Proizvodnja bijelih vina	16
2.5. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM	24
2.5.1. Plinska kromatografija	24
2.5.2. Spektrofotometrijska masa	26
2.5.3. SPME analiza	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1. ZADATAK	29
3.2. MATERIJAL I METODE	29
3.2.1. Karakteristike vina Graševina	29
3.2.2. Kemijska analiza vina	30
3.2.3. Analiza arome vina plinskom kromatografijom primjenom SPME analize	35
4. REZULTATI	37
5. RASPRAVA	43
6. ZAKLJUČCI	47
7. LITERATURA	49

Popis oznaka, kratica i simbola

pH	Broj koji služi kao mjera kiselosti, odnosno lužnatosti vodenih otopina
SPME	(Solid Phase Microextraction) – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi
GC	Plinsko-tekućinska kromatografija

1.UVOD

Govoriti o tehnologiji proizvodnje bijelih vina znači govoriti o jako senzibilnoj i profinjenoj tehnologiji. Karakteristike bijelih vina su svježina, mladost i tanko tijelo te se metaforički može usporediti sa „mladom plesačicom“ koja svoj maksimum daje u „punom cvijetu mladosti“.

Od bijelih vina se očekuje svježina i kiselost. Trebaju se potrošiti dok su mlada jer dugim stajanjem gube tvari arome i boje.

Na kakve je usporedbe vino nadahnjivalo velike ljude kroz povijest, govori i nekoliko sljedećih primjera; Homer: *„Vino vraća snagu umornome“*, Pasteur: *„Miris vina je poput najnježnije poezije.“*, ili Galileo: *„Vino je sunce otopljeno u vodi.“*

Vino je vrlo kompleksan proizvod, poznat i kao jedno od najstarijih prirodnih pića koje se proizvodi od grožđa. Grozd se sastoji od bobice i peteljkovine. Kožica sa sastoji od 6-10 slojeva, a bobicu čine kožica, sjemenka i meso.

Uz alkohol kao kvantitativno najzastupljeniji sastojak, vino sadrži na stotine spojeva različitih kemijskih struktura i svojstava. Svakoj grupi spojeva pripada veća ili manja važnost u definiranju kakvoće vina, a u fenolnom sastavu leži posebnost zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje.

Graševina u Hrvatskoj predstavlja jednu od najpopularnijih bijelih sorti. Vino je žućkaste boje, izraženog mirisa, ugodno gorkasto i suho. Sortni miris i aromu istaknute svježnine razvija već kao mlado vino.

Zadatak rada je ispitati utjecaj ranije zaustavljene alkoholne fermentacije i ostatka neprevrelog šećera na zadržavanje tvari arome i boje u vinu sorte Graševina. Alkoholna fermentacija bit će prekinuta kada se moštnom vagom odredi sadržaj šećera od 29-30°Oe. Nakon toga će se u navedenom vinu odrediti sadržaj tvari boje, polifenoli, flavonoidi i antioksidacijska aktivnost upotrebom spektrofotometra. Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka provest će se primjenom instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). U radu će biti korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A. Dobiveni rezultati usporedit će se s rezultatima uzorka vina sorte Graševina bez ranije zaustavljene alkoholne fermentacije.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. GROŽĐE

2.1.1. Podrijetlo i botanička svojstva vinove loze

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je vrsta koja se razvila na teritoriju zapadne Azije i Europe. Plodovi vinove loze se mogu koristiti u prahrani, proizvodnji nekih drugih prehrambenih proizvoda i farmaceutskih pripravaka. Prema paleobotaničkim nalazima postoji pretpostavka da su predstavnici rodova *Cissites* i *Paleovitis*, koje ujedno smatramo precima porodice *Vitaceae*, rasli već u vremenu donje krede. Iz tog doba potječe i najstariji dokaz o prisutnosti loza na području Hrvatske. Fosil lista vrste *Vitis teutonica* (**Slika 1**) koji pripada rodu *Cissites*, pronađen je u Hrvatskom zagorju. Odvajanjem kontinenata te tijekom razdoblja glacijacije koji su se odvijali tijekom kvartara, došlo je do odvajanja američke i euroazijske grupe roda *Vitis*. Evolucija pojedinih vrsta odvijala se u različitim okolinskim uvjetima iz čega proizlaze i razlike u biološkim svojstvima različitih vrsta roda *Vitis* koje danas poznajemo (Maletić i sur., 2015.).



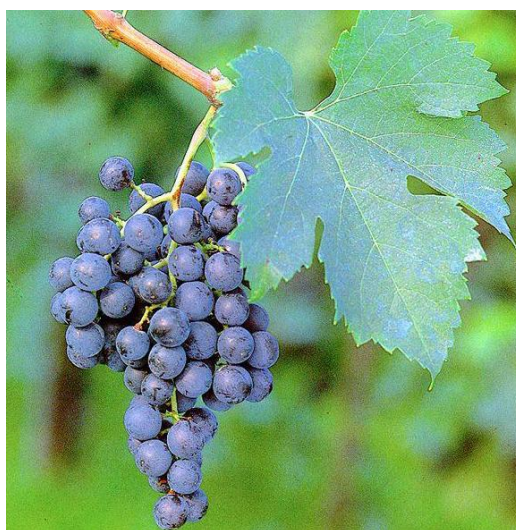
Slika 1 Fosil lista vrste *Vitis teutonica*(Maletić i sur., 2015.).

Povijest vinograda i uzgoj vinove loze u Hrvatskoj se proteže dugi niz godina, a neki podaci upućuju i na pojavu vinove loze prije Kristova vremena. Dolaskom američkih bolesti i filoksere u drugoj polovini 19. stoljeća nastupa sve veće propadanje vinograda, a s time i do velikog broja autohtonih sorti. U Hrvatskoj se može pronaći velik broj autohtonih sorti, njih čak oko 130 (Ivandija, 2008.).

Povijest vinove loze u Dalmaciji je stara više od dvije tisuće godina. O tome posebno svjedoči zapis iz 2.st.pr.Kr. grčkog pisca Agatarhida koji posebno hvali vino s otoka Visa. Zahvaljujući dobrom geografskom položaju i klimatskim uvjetima, početkom 19. stoljeća u Dalmaciji je postojalo preko 400 sorata. Iznimku je činila sorta Tribidragkoja se spominjala već u 16. stoljeću. Početkom 20. stoljeća pojavom štetnika poput filoksere i peronospore te razvojem bolesti, dolazi do izumiranja brojnih autohtonih sorata. Usprkos tome, Dalmacija danas i dalje predstavlja kraj bogat autohtonim sortama vinove loze (Andabaka i sur., 2016.).

Vitis vinifera (**Slika 2**) je jedna od najstarijih kultiviranih biljnih vrsta. Pripada botaničkoj porodici *Vitaceae*. Za vinogradarsku proizvodnju najvažniji je rod *Vitis* kojeg čine podrodovi *Muscadinia* i *Euvitis*. Rod *Euvitis* se dijeli na 1 euroazijsku, 30 američkih i 40 azijskih vrsta. Euroazijska vrsta (*Vitis vinifera*) se dijeli na *Vitis vinifera* var. *silvestris* (europska divlja loza) i *Vitis vinifera* var. *sativa* (europska kulturna loza) (Pichler, 2017.).

Američke vrste se koriste kao podloge za europske vinske loze koje uključuju *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* i *Vitis berlandieri*. Postoje i različiti hibridi vinove loze, a to su američko-američki, europsko-američki i kompleksi hibridi (Pichler, 2017.).



Slika 2 *Vitis vinifera* (Pichler, 2017.).

2.1.2. Mehanička i kemijska svojstva

Grozđ se sastoji od bobice i peteljkovine. Kožica sa sastoji od 6-10 slojeva, a bobicu čine kožica, sjemenka i meso. Kožica ima veliki značaj zbog svog kemijskog sastava koji ima veliki utjecaj na kvalitetu vina, a zahvaljujući tvarima arome i boje daje vinima karakterističan okus. Pojedine sorte, kao što je mirisni traminac, sadrži arome koncentrirane u kožici.

Kemijski sastav kožice sastoji se od 3-7% kiselina, 1-3% šećera, 1,5-5,2% dušičnih tvari i 0,3-3% pepela.

Bobica sadrži 2-7 sjemenki. Ona sadrži 12-20% ulja, 3-6% tanina, 30-36% šećera, 25-45% vode i 1-5% pepela.

Meso po kemijskom sastavu sadrži 10-27% šećera, 0,5-1% kiselina, 75-80% vode, 0,3-1% mineralnih tvari, 0,02-0,15% dušičnih tvari, 0,1-0,4% tanina i 0,3-0,65% celuloze.

Masulj sadrži kožicu, sjemenke, mošt i peteljke, a sastav mu se mijenja ovisno o količini pojedinih sastojaka i sorte. Najčešće se sastoji od 70-90% mošta, 8-20% kožice i 2-7% sjemenki. Cijedenjem masulja dobiva se groždani sok ili masulj, odnosno samotok. Na kakvoću mošta utječu šećeri, posebno glukoza i fruktoza te organske kiseline limunska, vinska i jabučna. Osim navedenih sastojaka, na kakvoću također utječu i klima, sorta loze, sastav tla te zaštitne i agrotehničke mjere.

Peteljkovina služi za prenošenje hranjiva do bobe i kao nosač boba. Sastoji se od peteljki i peteljčica. Ima značajan utjecaj na kvalitetu mošta i vina. Sorte s manjom prisutnošću peteljkovine imaju veće iskorištenje (Zoričić, 1996.).

Kakvoća grožđa ovisi o sorti i okolinskim uvjetima, dok kakvoća vina ovisi o kakvoći grožđa, ekološkim faktorima, vremenskim prilikama, tehnologiji proizvodnje grožđa i tehnologiji proizvodnje vina. Najvažniji sastojci grožđa su šećeri, kiseline, tvari boje i arome. Kvalitetne sorte imaju 18-22% šećera, a visokokvalitetne sorte imaju od 22-28% šećera. Kiseline koje su prisutne u grožđu su vinska, jabučna, limunska, askorbinska, oksalna, glikolna i glukonska kiselina. Udio kiselina u grožđu i moštu je od 5-15 g/L. Najvažniji hlapljivi spojevi primarne arome grožđa su monoterpeni (linalol, geraniol, nerol, α -terpineol, citronelol, hotrineol). Oni su odgovorni za cvjetne i voćne mirise aromatičnih sorti (Pichler, 2017.).

2.2. VINO

2.2.1. Definicija i podjela vina

Prema Zakonu o vinu (Narodne novine br 96/2003.), vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa.

Podjela vina u odnosu na Zakon o vinu:

a) Vina u užem smislu riječi:

- Mirna vina,
- Pjenušava vina,
- Biser vina,
- Gazirana vina.

b) Specijalna vina:

- Desertna vina,
- Aromatizirana vina,
- Likerska vina.

Obzirom na boju vina se dijele na bijela, ružičasta i crna.

S obzirom na sadržaj neprevrelog šećera mirna vina se dijele na suha, polusuha, poluslatka i slatka. Pjenušava, biser i gazirana vina dijele na vrlo suha, suha, polusuha, poluslatka i slatka vina.

Prema kakvoći mirna vina se dijele na:

a) Stolna vina

- Stolno vino s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom,
- Stalno vino bez oznake zemljopisnog podrijetla.

b) Kvalitetna vina

- Kvalitetno vino s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom.

c) Vrhunska vina

- Vrhunsko vino s kontroliranih i ograničenih vinorodnih područja,
- Vrhunsko vino s kontroliranih i ograničenih specifičnih vinorodnih područja,
- Predikatna vina s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom,
- Kvalitetna i vrhunska vina koja su u podrumskim uvjetima čuvana pet ili više godina, a od toga najmanje tri godine u boci, mogu nositi oznaku „arhivsko vino“ (Zakon o vinu, 2003.).

2.2.2. Sorte grožđa za proizvodnju vina

Najvažnije vinske sorte u Republici Hrvatskoj su:

Kontinentalna Hrvatska

BIJELA VINA

- Graševina bijela
- Rizling Rajnski bijeli
- Chardonnay bijeli
- Traminac mirisavi
- Traminac crveni
- Pinot bijeli
- Pinot sivi
- Sauvignon bijeli
- Plamenka bijela

CRNA VINA

- Frankovka crna
- Cabernet Sauvignon crni
- Portugizac crni
- Pinot crni
- Zweigelt
- Merlot crni

Primorska Hrvatska

BIJELA VINA

- Malvazija Istarska bijela
- Pošip bijeli
- Grk bijeli
- Maraština bijela
- Žilavka bijela
- Kujundžusa bijela
- Žlahtina bijela

CRNA VINA

- Plavac Mali
- Babić crni
- Merlot crni
- Teran crni
- Cabernet Sauvignon crni
- Plavina crna
- Crljenak (Pichler, 2017.).

2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA

2.3.1. Alkoholi

Alkohol etanol jedan od vodećih sastojaka vina, a njegov postotni raspon se kreće od 12 do 14 vol. %. Nastaje metabolizmom kvasaca u alkoholnoj fermentaciji. U mladim vinima se prepoznaje po peckanju, a zbog alkohola se mijenjaju fizikalna svojstva vode. Povećanjem alkohola smanjuje se viskozitet vode dok se topivost povećava (Alpeza, 2008.).

Vino najčešće sadrži jednovalentne alkohole (metanol i etanol), viševalentne (glicerol, 2-3 butandiol, manit) i više alkohole (izoamil, 1-propanol, izobutanol, amilni alkohol, 2-feniletanol) (Pichler, 2017.).

2.3.2. Ugljikohidrati

Uz vodu, šećeri su najzastupljeniji sastojci grožđa. Zastupljeni su u prosjeku 200-250 g/L. U grožđu su šećeri glukoza i fruktoza u ravnomjernom odnosu 1:1. Šećer reducira okus gorčine, kiselosti i osjet trpkocje. Slatka vina se proizvode s puno većim sadržajem šećera, preko 100g/L i u takvim vinima je dominantan slatki okus. U zemljama gdje dominira hladnija klima dopušteno je dodavanje industrijskog šećera ili samo koncentriranog mošta, u mošt ili masulj prije vrenja, zbog slabije sinteze šećera. Inače je zabranjeno dodavanje šećera u vino, osim kod nekih specijalnih vina (Alpeza, 2008.).

Šećeri nastaju procesom fotosinteze, a najvažnije su heksoze D-glukoza i D-fruktoza. U početku dozrijevanja dominira glukoza, ali se sazrijevanjem i djelovanjem epimeraze povećava udio fruktoze i to predstavlja jedan od indikatora zrelosti. Udio šećera u grožđu i moštu varira u odnosu na sortu, okolinske i vremenske uvjete. Kvalitetne sorte imaju 18-22% šećera, dok viskokvalitetne sorte imaju 22-28% šećera (Prce, 2014.).

2.3.3. Kiseline

Prema Pravilniku o vinu, vino mora sadržavati najmanje 4,5 g/L, a najviše 14 g/L ukupnih kiselina uzraženih kao vinska kiselina (Zakon o vinu, 2003.).

Kiseline u vinu su organske, anorganske i soli različitih kiselina. Organske kiseline mogu biti hlapljive i nehlapljive, a organske kiseline zastupljene u grožđu su vinska, limunska, jabučna, oksalna, askorbinska, glikolna i glukonska kiselina samo ukoliko je vino zaraženo sa sivom plijesni. Udio kiselina u grožđu i moštu se kreće od 5-15 g/L, a najveći dio preuzimaju vinska i jabučna kiselina. Vinska kiselina je temeljna i najjača organska kiselina mošta pa zapravo najviše utječe na pH vrijednost. Askorbinska kiselina sprječava oksidaciju fenola. Octena kiselina je najzastupljenija hlapljiva kiselina u vinu, ali prevelik udio octene kiseline simbolizira bolesno vino.

Anorganske kiseline se u vinu javljaju u obliku kalcijevih i kalijevih soli. Ukupna kiselost se utvrđuje postupkom neutralizacije sa NaOH (Prce, 2014.).

2.3.4. Aldehidi i ketoni

Aldehidi i ketoni su skupine spojeva koje tvore karakteristične arome i bouquet vina ili neke nepoželjne mirise. Imaju značajan utjecaj jer vinu daju voćni miris, a najzastupljeniji je acetaldehid. Glavni razlog sumporenja bačvi je inaktivacija aldehida i ketona. Etanal vinima daje miris svježih zelenih jabuka i lako se uklanja dodatkom sumporovog dioksida. Heksanal vinima daje biljni miris, dok vanilin daje ugodan miris vanilije.

Najzastupljeniji ketoni u moštu i vinu su aceton, acetoin i diacetil. Njihova zastupljenost u grožđu i moštu je izrazito mala (Prce, 2014.).

2.3.5. Esteri

Estere u vinu nalazimo u obliku acetatnih estera i etil estera masnih kiselina. Količine hlapljivih estera u vinu su relativno niske te iznose svega nekoliko mg/L (Pichler, 2017.).

Esteri nastaju reverzibilnom reakcijom alkohola i kiselina enzimskom esterifikacijom tijekom fermentacije i kemijskom esterifikacijom tijekom dugog odležavanja i starenja. U grožđu ih ima malo za razliku od vina gdje je znatno povećan njihov udio (Prce, 2014.).

Esteri octene kiseline su etil acetat, propil acetat, izopropil acetat, izoamil acetat, izobutil acetat i 2-feniletal acetat. Svi ti esteri daju svježinu vinu i ugodnog su mirisa.

Esteri masnih kiselina su etil propionat, etil heksanoat, etil valerijat, etil oktanoat i etil dekanat (Pichler, 2017.).

2.3.6. Tvari arome

Ovisno o podrijetlu i načinu formiranja, arome u vinu možemo podijeliti na primarne (sortne), sekundarne (fermentativne) i tercijalne arome (bouquet). Primarne arome su terpeni spojevi (linalol, geraniol, nerol) i alkoholi sa 6 ugljikovih atoma: 1-heksanol, 2-heksanol, trans i cis forme 2 i 3 heksen-1-ol (Pichler, 2017.).

Osim primarne, postoji i sekundarna aroma koja se razvija tijekom obrade grožđa. Aroma fermentacije je produkt alkoholne i malolaktičke fermentacije, dok je aroma starenja rezultat dozrijevanja i starenja vina i nusproizvod reakcija vina i drveta (Prce, 2014.).

Tvari arome stvaraju specifičnu aromu vina tzv. „bouquet“. Poznate su mnogobrojne tvari arome, a one uključuju: hlapljive karbonske kiseline, alkohole, aldehide, ketone, estere, više masne kiseline, terpene, eterična ulja i tvari slične voskovima i smolama. Monoterpeni su nositelji sortne arome, a uključuju linalol, nerol, geraniol, citronelol, linalil acetat i α -terpineol (Prce, 2014.).

2.3.7. Enzimi

Enzimi imaju značajnu ulogu u vinarstvu i podrumarstvu jer djeluju kao pokretači kemijskih procesa tijekom fermentacije, vinifikacije i starenja vina te pri razvijanju sekundarnog

bouqueta. Uglavnom su zaduženi za provođenje reakcija oksidacije i hidrolize. Najvažniji enzimi su saharaza, pektaza, tanaza i katalaza (Prce, 2014.).

Postoje dvije velike skupine enzima koje se koriste u vinarstvu, a to su depolimerizacijski i deesterifikacijski enzimi. Depolimerizacijski enzimi cijepaju α -1,4 glukozidni vez cijepajući poligalakturonski lanac, a u njih ubrajamo poligalakturonaze, pektat lijaze i pektin lijaze. Deesterifikacijski enzimi cijepaju esterski vez metanola i karboksilnih skupina galakturonske kiseline oslobađajući metanol. Deesterifikacijski enzimi također prevode viskoesterificirane pektine u niskoesterificirane pektine i pektinsku kiselinu (Pichler, 2017.).

Saharaza provodi hidrolizu saharoze u glukozu i fruktozu, dok je pektaza važna je pri bistrenji vina jer hidrolizira pektinske tvari na poligalakturonsku kiselinu i metanol. Tanaza u vinu katalizira tvorbu taninskih tvari i dolazi iz pljesnivog grožđa. Katalaza katalizira odvajanje kisika iz vodikova peroksida i ostalih peroksidnih spojeva (Prce, 2014.).

2.3.8. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi imaju značajnu ulogu u procesima starenja i stabilizacije vina te u tvorbi organoleptičkih svojstava i vitaminske vrijednosti.

Prema sastavu ih dijelimo na:

- derivate flavona i leukoantocijana, katehine, antocijane i flavonoide i
- derivate oksi-cimetne kiseline.

Fenolne tvari vrlo lako oksidiraju u dodiru sa zrakom, a sama oksidacija je intenzivnija uz enzimsko djelovanje polifenoloksidaze što dovodi do procesa posmeđivanja vina.

Taninske tvari predstavljaju važan sastojak vina za vrijeme vinifikacije i odležavanja vina. One zgrušavaju proteine i tako dovode do bistrenja i taloženja vina. Također štite vino od razvoja octenih bakterija te bolesti vina. U poželjnim količinama poželjno utječu na okus vina, dok veće količine stvaraju opor okus. Poželjna količina tanina u bijelim vinima iznosi najviše do 0,5 g/L.

Bojane tvari su smještene u kožici bobica. Zrenjem bijelo grožđe dobiva žuti, zlatnožuti do jantarno žuti pigment. Karotenoidi i derivati flavona predstavljaju boju bijelih sorti.

Glavni predstavnici derivata oksicimetnih kiselina su kininska, kumarinska i kafeinska kiselina. Njihovo prisustvo u vinu uzrokuje promjenu boje vina. Javljaju se u vezanom i slobodnom obliku (Vrdoljak, 2009.).

2.3.9. Mineralne tvari (pepeo)

Mineralnim tvarima ili pepelom nazivamo anorganski zaostatak nastao ispravljanjem vode na vodenoj kupelji i žarenja suhe tvari vina. Njihova količina se kreće od 1,1-4,6 g/L ovisno o kvaliteti grožđa, zrelosti, sorti i drugim parametrima. Minerali koji se nalaze u obliku slobodnih iona ili su vezani u spojeve utječu na pojavu metalnog okusa vina ili na pojavu lomova (Prce, 2014.).

Pepeo se uglavnom sastoji od kalijevih, kalcijevih i magnezijevih soli karbonatne, fosfatne i sumporne kiseline te tragova željeza, bakra, mangana, fluora i drugih. Željezo, mangan, cink, nikal i kobalt kao mikroelementi imaju veliku ulogu u razvoju vinove loze. Vino u kojem je zastupljena veća količina mikroelementa ima bolju aromu i bouquet (Vrdoljak, 2009.).

2.3.10. Ekstrakt vina

Ukupni suhi ekstrakt u vinu čine sve mineralne i organske tvari koje pod specifičnim fizikalnim uvjetima nisu hlapljive, a uključuju ugljikohidrate, mineralne tvari, polifenole, više alkohole, tvari boje i nehlapljive kiseline. Ekstrakt u vinu može biti ukupni suhi ekstrakt, nereducirani ekstrakt bez šećera i reducirajući ekstrakt. Pored navedenih ekstrakta računa se i ekstrakt bez šećera i bez hlapljivih kiselina (Prce, 2014.).

Kvalitetne i vrhunske sorte daju vina s više ekstrakta, dok stolne sorte daju vina s manje ekstrakta. Postoje brojni čimbenici koji utječu na to koliko će pojedina sorta dati ekstrakta u vinu, a to su klimatske prilike, geomorfološki čimbenici, vrsta tla i zdravstveno stanje grožđa. Zbog toga krajevi s manje sunca daju manje ekstrakta, a krajevi s više sunca daju više ekstrakta (Vrdoljak, 2009.).

2.3.11. Dušične tvari

Spojevi s dušikom uključuju proteine, amide, amine, biološke amine, polipeptide, nukleinski dušik i heksozamine. Dušični spojevi prelaze iz mošta u vino. Dušične tvari su pozitivno nabijeni koloidi koji utječu na stabilnost jer uzrokuju zamućenje. Dodatkom tanina kao negativnih bistrila one se talože na dno (Prce, 2014.).

2.3.12. Koloidi vina

Koloidi su čestice veličine 1 – 100 μm . One nepovoljno djeluju na organoleptička svojstva vina jer uzrokuju zamućenje i povećanje viskoznosti. Dije se na liofilne i liofobne koloidne. Liofilni koloidi uključuju proteine, pektinske tvari i sluzave tvari vina. Oni povećavaju kiselost vina jer imaju sposobnost vezanja vode. Liofobni koloidi pokazuju veliku osjetljivost na elektrolite i mala promjena pH vrijednosti dovodi do njihove koagulacije (Vrdoljak, 2009.).

2.3.13. Proteini

Proteini su važne esencijalne i funkcionalne makrokomponente. Sastoje se od slijeda aminokiselina koje su povezane peptidnim vezama. Prisutnost proteina u moštu uzrokuje nestabilnost vina. Tretman sa bentonitom se koristi za uklanjanje nestabilnih proteina iz bijelog vina, ali tretiranje mošta s njim bi se ipak trebalo smatrati prikladnim samo u industrijskom vinarstvu kako bi se dobila što jednostavnija vina. Sprječavanje proteinskog zamućivanja uz dodatak bentonita temelji se na njegovim adsorbtivnim i elektrostatičkim svojstvima. Zahvaljujući svom negativno nabijenom naboju bentonit taloži termolabilni dio bjelančevina te smanjuju samu pojavu posmeđivanja, uz odstranjivanje tirozinaze. Također, adsorbira i neke pesticidne ostatke.

Obzirom na pH vrijednost, proteini mogu biti pozitivno i negativno nabijeni ili neutralni ukoliko su u izoelektričnoj točki. Proteini u moštu ili vinu se mogu analizirati visokotlačnom tekućinskom kromatografijom s molekularnim odjeljivanjem. Sok proizveden neposrednim prešanjem grožđa kojemu su uklonjene stabljike ima veći sadržaj proteina, za razliku od soka kojemu su stabljike ostale cijele (Džolan, 2012.).

2.4. PROIZVODNJA VINA

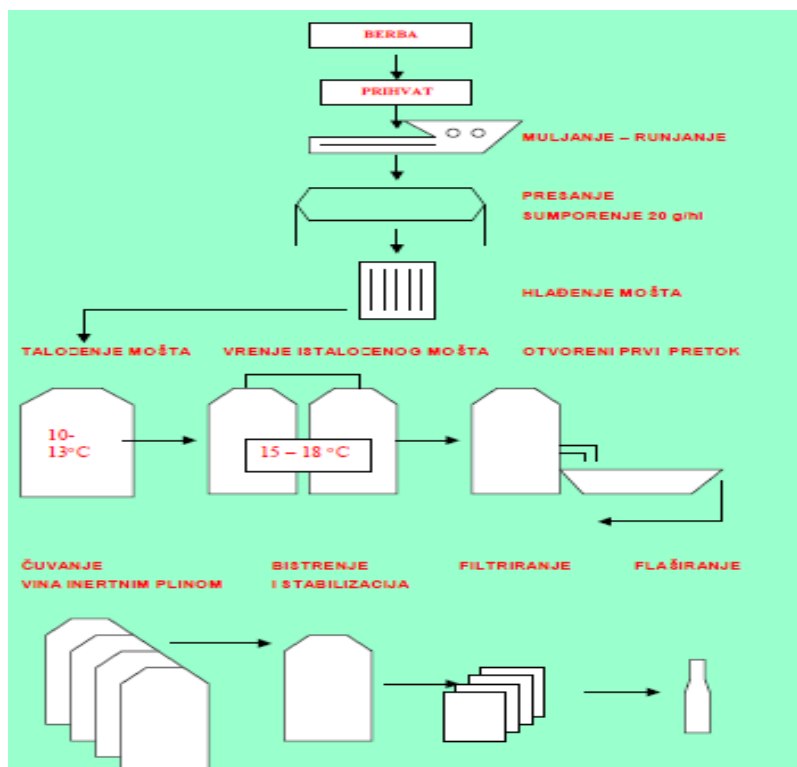
Vino je fermentirani sok dobiven od različitih sorti grožđa. Kvaliteta vina je određena zemljopisnom lokacijom vinograda, raznolikošću loze i načinom njenog uzgoja, prirodom tla u kojem se uzgaja vinova loza, klimom, vremenom vegetacije, načinom fermentacije, sazrijevanjem soka i vještinom vinara (Cracknell i Nobis, 1990.).

Nakon sazrijevanja, grožđe se isporučuje u vinariju gdje slijedi muljanje kako bi se oslobodili pulpa i sok. Obzirom na vrstu vina stabljika, koža i sjemenke se ili uklone ili se ostave sa sokom za dobivanje boje i tanina. Potom slijedi faza fermentacije koja može trajati od nekoliko dana do tjedan dana ili više i odvija se u velikim bačvama. Tradicionalno su bačve pravljene od drveta, ali u novije vrijeme se sve više koriste bačve od nehrđajućeg čelika ili staklenog cementa. Nakon završetka fermentacije se vino odvaja od bačve, dok se kod proizvodnje crnih vina ono podvrgava drugoj fermentaciji. Neka vina su se proizvodila da bi se konzumirala mlada, dok su se druga vina čuvala mjesecima ili godinama i to najčešće u drvenim bačvama (Cracknell i Nobis, 1990.).

2.4.1. Proizvodnja bijelih vina

Tehnološki proces proizvodnje bijelih vina (**Slika 3**) se sastoji od tri osnovne faze: berbe grožđa i prerade, alkoholnog vrenje mošta i formiranja prave kakvoće vina.

Pravo vrijeme za berbu grožđa je vrijeme kada grožđe postigne tehnološku zrelost. Branje grožđa se izvodi ručno ili strojno i tada treba nastojati što manje oštetiti pokožicu bobica. Prijem grožđa u vinariju se sastoji od sljedećih faza: vaganja grožđa, promatranja vizualnog izgleda te određivanja šećera i ukupnih kiselina (Vrdoljak, 2009.).



Slika 3 Shema vinifikacije bijelih vina (Web 1)

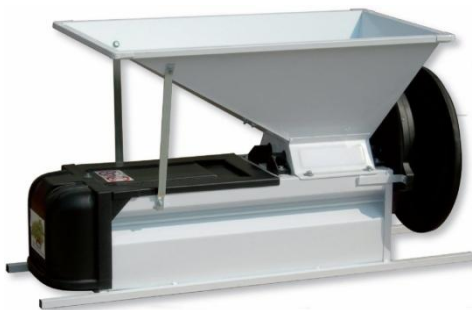
2.4.2. Berba grožđa

Prerada grožđa u vino započinje sa samom berbom grožđa i vrlo je važan čimbenik za kvalitetu i senzorska svojstva vina. Berbu je najbolje provoditi tijekom suhog vremena jer tako dobivamo najkvalitetniji mošt, pospješujemo početak vrenja, a olakšana je i sama berba. Grožđe nije uvijek tehnološki zrelo ni potpuno zdravo te zbog toga enolog ima težak zadatak da od takve sirovine proizvede kvalitetno vino (Web 1).

2.4.3. Runjenje i muljanje

Muljanje-runjenje predstavlja prvu fazu u preradi grožđa. Provodi se s ciljem da se bobica odvoji od peteljke (runjenje) i potom zgnječi (muljanje) (**Slika 4**) da bi se oslobodio mošt. Gnječenje nogama predstavlja jedan od najstarijih načina muljanja. Danas kada postoje pneumatske preše koje ne oštećuju krute dijelove grozda, faza muljanja se može i preskočiti i direktno se može prešati cijelo grožđe (Web 1).

Ukoliko grožđe nije zdravo, postupak sumporenja treba provesti već kod muljanja i runjenja dodatkom kalijevog metabisulfita (vinobrana) ili 5% otopine sumporaste kiseline (Pozdervić, 2013.).



Slika 4 Muljače sa odvajanjem peteljki (Web 4)

2.4.4. Ocjeđivanje i prešanje

Prije svakog procesa prešanja potrebno je provesti postupak ocjeđivanja jer se prilikom punjenja preša odvaja jedan dio samotoka. Za smanjenje volumena masulja kojeg trebamo prešati koriste se uređaju „ocjeđivači“ (**Slika 5**) koji odvajaju veći dio samotoka. Na taj se način se skraćuje sam proces jer se kapacitet preša povećava (Web 1).



Slika 5 Ocjeđivač (Web 1)

Postupak prešanja se može provoditi kontinuirano i diskontinuirano, a sam proces se odvija u dvije faze. To su :

1. Prskanje kože bobica (oslobađa se samotok iz središnjeg dijela bobice) i
2. Gnječenje bobica (povećanjem pritiska se oslobađa sok iz periferne zone) (Web 1).

Prije prešanja se masulj može depektinizirati u cilju razgradnje pektina i protopektina radi olakšanja prešanja i većeg iskorištenja mošta.

Kako bi spriječili nepoželjnu oksidaciju mošta, prešanje treba provesti kroz što kraće vrijeme. Prešanje ne smije biti naglo i tlak se mora postupno povećavati. Pri naglom povećanju tlaka trop se brzo sabije i onemogućava otjecanje mošta (Pozderović, 2013.).

Prema načinu rada preše (**Slika 6**) dijelimo na kontinuirane i diskontinuirane. Najčešće se upotrebljavaju kontinuirane pužne preše, a njihova najveća prednost leži u tome da se jednom prešom može preraditi relativno velika količina grožđa (Web 1).

Diskontinuirane preše prema načinu rada dijelimo na: mehaničke, hidrauličke, hidropreše, pneumatske i vakuum preše, dok ih prema izvedbi dijelimo na vertikalne i horizontalne (Web 1).



Slika 6 Preša za grožđe (Web 2)

2.4.5. Sumporenje mošta i vina

Ukoliko sumporenje nije provedeno tijekom muljanja grožđa, mošt se sumpori nakon prešanja. Količina sumporaste kiseline koju treba dodati ovisi o zdravstvenom stanju grožđa, sastavu mošta i temperaturi. Uglavnom se provodi se dodatkom 100-150 ml/hL 5% sumporaste kiseline ili 10-15 g/hl vinobrana (kalijevog metabisulfita). Mošt treba sumporiti samo onoliko koliko je to potrebno jer sumpor negativno djeluje na zdravlje čovjeka. Postoji nekoliko razloga sumporenja mošta, a to su da sumpor taloži nečistoće iz mošta i tako ubrzava bistrenje vina, sprječava razmnožavanje štetnih mikroorganizama i divljih kvasaca u

moštu te sprječava oksidacijske procese enzimskog i neenzimskog posmeđivanja (Pozderović, 2013.).

2.4.6. Depektinizacija mošta

Depektinizacija je postupak koji se provodi dodatkom pektolitičkih enzima. Provodi se na temperaturi od 10-25°C i traje od pola sata do 3-4 sata. Samo ukoliko se provodi na nižoj temperaturi onda je potrebno duže vrijeme. Svrha depektinizacije je razgradnja pektina čime se smanjuje viskozitet mošta i ubrzava bistrenje mošta i vina (Pichler, 2017.).

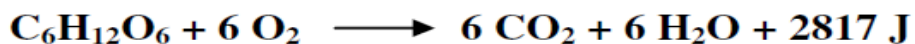
2.4.7. Bistrenje mošta

Bistrenje mošta je taloženje nečistoća iz mošta koja su došla zajedno sa groždem. Provodi se spontanim taloženjem kroz 24 h ili bistrenjem uz dodatak bistrila. Ukoliko je mošt izbistren sigurnije je vrenje mošta. Bistrenjem vina uz dodatak bistrila vežu se aroma, tvari boje i ostale tvari koje utječu na okus vina, stoga je bistrenje potrebno provesti onda kad će se oduzeti najmanje arome. Koriste se preparati na bazi bentonita i želatine ili bentonita i želatine+kazein ili se koriste preparati na bazi silicijevog dioksida i želatine. Bistrenje s bistrilima se provodi u vertikalnim tankovima gdje se mošt prvo mora ohladiti na 15°C. Potom se dodaju bistrila i nakon 3-4 sata se izdvoji talog. Slijedi dekantiranje bistrog mošta i filtracija taloga uz naplavni filter (Pozderović, 2013.).

2.4.8. Glavno vrenje

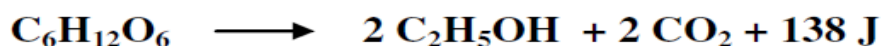
Alkoholna fermentacija je najvažnija faza u proizvodnji vina, a predstavlja proces koji provode kvasci nizom enzimskim reakcijama kojima prevode šećer u alkohol te stvaraju ugljikov dioksid i toplinu. Ona može biti aerobna i anaerobna. Aerobna fermentacija pokazuje veliku važnost u razmnožavanju kvasaca, dok anaerobna fermentacija služi za tvorbu alkohola (Pichler, 2017.).

U aerobnoj fazi fermentacije (**Slika 7**) kvasci koriste kisik iz zraka i potpuno razlažu šećer do ugljikova dioksida. Oslobođena energija se koristi za razmnožavanje selekcioniranog kvasca (Vrdoljak, 2003.).



Slika 7 Aerobna faza fermentacije (Vrdoljak, 2003.)

U anaerobnoj fazi (**Slika 8**) se šećeri razlažu do etanola i ugljikova dioksida te se oslobađa znatno manja količina energije (Vrdoljak, 2003.).



Slika 8 Anaerobna faza fermentacije (Vrdoljak, 2003.)

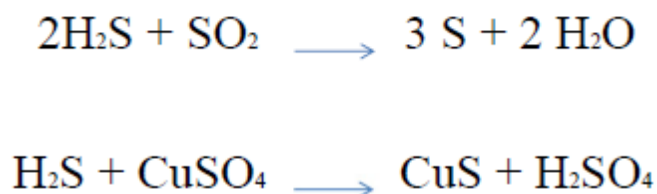
Mehanizam alkoholne fermentacije počiva na složenim enzimskim reakcijama u kojima kvasci glikolizom prevode glukozu do piruvata. Uz piruvat dekarboksilazu se piruvat prevodi u acetaldehid, uz oslobađanje ugljikova dioksida. Djelovanjem alkohol dehidrogenaze, acetaldehid se prevodi u etanol. Uz navedene produkte fermentacije, postoje i sekundarni produkti fermentacije, a to su aldehidi, ketoni, glicerol, viši alkoholi te octena, jantarna i mliječna kiselina. Postoje brojni faktori koji utječu na alkoholnu fermentaciju, a to su temperatura, kisik, sastav mošta, sadržaj alkohola, kiselina, šećera i drugih tvari (Pichler, 2017.).

Alkoholna fermentacija se provodi u drvenim, metalnim ili betonskim vrionicima, u dvije odvojene faze:

1. Glavno (burno) vrenje: Toplo na 15-18°C u trajanju do 10 dana, a hladno na 10-15°C u trajanju od 7 do 14 dana i
2. Tiho (naknadno) vrenje traje od 3 do 6 tjedna na temperaturi na minimalnoj temperaturi koja iznosi 15°C (Vrdoljak, 2009.).

2.4.9. Tiho vrenje

Nakon što se alkoholna fermentacija privede kraju, vrionici se dopunjavaju kako bi se održali anaerobni uvjeti. Potom slijedi faza tihog vrenja (**Slika 9**) u kojoj dolazi do znatnog opadanja temperature vina i oslobađanja nagomilanog ugljikova dioksida. U toj fazi odvija se i prirodno spontano bistrenje i taloženje nepoželjnih produkata vrenja poput stanica vinskog kvasca, proteina i drugih (Vrdoljak, 2003.).



Slika 9 Tiho vrenje (Pichler, 2017.)

Prilikom tihog vrenja odumire znatan broj satnica kvasaca što ima za posljedicu znatno opadanje intenziteta fermentacije. U ovoj fazi također dolazi do završetka procesa mliječne fermentacije jabučne kiseline u vinu. Jabučno - mliječno (malolaktičko) vrenje je spontani proces prelaska opore jabučne u blagu mliječnu kiselinu. Po završetku tihog vrenja u vinu ostaje najviše 1,5-2,5 g/L reducirajućeg šećera (Grgić, 2015.).

2.4.10. Odležavanje na talogu

Nakon završetka fermentacije slijedi pretok vina čime uklanjamo grubi talog iz mladog vina. Uz to, također, uklanjamo stanice kvasaca koje su bogate aminokiselinama. Budući da tim postupkom osiromašujemo vino, cilj nam je ublažiti taj nepoželjan efekt uz *sur-lie* tehnologiju odležavanja vina na talogu. Provodi se u drvenim *barrique* bačvama (**Slika 10**) u trajanju od pola do preko jedne godine. U tim bačvama se provodi i alkoholna fermentacija iako se dio fermentacije može provesti i u inoxu. Nakon fermentacije se vino ne odvaja od taloga već i dalje ostaje s talogom uz povremeno miješanje (Grgić, 2015.).



Slika 10 Barrique bačve (Grgić, 2015.)

2.4.11. Pretok mladog vina

Vrijeme prvog pretoka mladog vina ovisi o tome da li je u potpunosti završena fermentacija, da li je vino stabilno na kisik, jesu li djelomično sedimentirane krupnije nečistoće i da li je nastupila malolaktička fermentacija. Kako bi izbjegli mogućnost nastanka tzv. smeđeg loma vina, prije prvog pretoka mladog vina trebamo provesti zračni test kako bi utvrdili da li je vino podložno oksidaciji. Uz to također treba provjeriti sadržaj slobodnog sumporovog dioksida koji bi se trebao kretati oko 20 mg/l. Sumporenje vina se provodi namanje 48 sati prije pretakanja vina. Ukoliko je vino poprimilo miris na trula jaja zbog prisutnosti sumporo vodika i ako je prevrelo vino ostalo sluzavo, moramo provesti otvoreni pretok mladog vina. Nakon provedenog prvog pretoka vina trebao bi nastupiti prirodan proces stabilizacije vina. Nakon pretakanja treba nastaviti njegovati mlado vino da bi ga se usmjerilo prema optimalno mogućem dozrijevanju jer je vino podložno stalnim biokemijskim i fizikalnim promjenama (Grgić, 2015.).

2.5. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

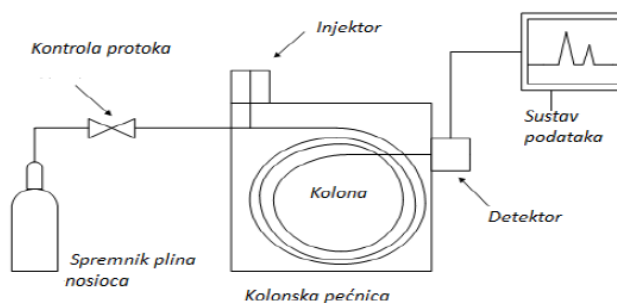
2.5.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija se razvila 1941. godine na prijedlog da se u tekućinskoj kromatografiji zamjeni tekuća mobilna faza sa plinskom, uz argument da bi se u plinu bolje raspršivale čestice nego u tekućini, što bi dovelo do brže separacije i bolje učinkovitosti kolone. Ona se koristi za odjeljivanje, kvantitativnu analizu i izolaciju pojedinih komponenata smjese.

Obzirom na fizikalno stanje nepokretne (stacionarne) faze postoje:

- Plinsko-tekućinska kromatografija (GLC, GC) i
- Plinsko-čvrsta kromatografija (GSC).

Plinski kromatogram (**Slika 11**) se sastoji od putujuće mobilne faze, kolone sa stacionarnom fazom, injektora, detektora i sustava za snimanje podataka (Blažević, 2016.).



Slika 11 Shema plinskog kromatografa (Blažević, 2016.)

Injektor je uređaj za unošenje uzorka i spojen je s kolonom. Može biti izravni, prenosni, kolonski i sa isparivačem. Kromatografske kolone su srce sustava, a dijelimo ih na preparativne i analitičke. Detektori mogu biti univerzalni i selektivni. Univerzalni daje odziv za svaki sastojak u eluatu osim za mobilnu fazu, a selektivni daje odziv za određene grupe sastojaka u eluatu. Danas je umjesto pisača sustav uglavnom spojen na računalo gdje se spremaju podaci (Primorac, 2007.).

Sastojci su raspoređeni između dvije faze, od kojih je jedna stacionarna (nepokretna), a druga mobilna (pokretna) i kreću se u određenom smjeru. Mobilnu fazu čini inertni plin uz koji se provodi eluiranje, a samo odvajanje sastojaka na GC koloni je uvjetovano njihovom

razlikom u hlapivosti. Naizmjeničnom adsorpcijom i desorpcijom lakše hlapivih sastojaka se provodi razdvajanje smjese hlapivih sastojaka uz prisutstvo plina nositelja (Vrdoljak, 2009.).

Parovi mobilna-stacionarna faza odabiru se tako da je moguće ostvariti raspodjelu komponenata uzorka do nekog određenog stupnja. Komponente koje stacionarna faza jače zadržava sporije prolaze kroz kolonu, dok one koje stacionarna faza slabije zadržava putuju brže. Kao posljedica razlike u brzini putovanja kroz kolonu, komponente uzorka se razdvajaju u vrpce koje se dalje mogu kvantitativno i kvalitativno analizirati (Primorac, 2007.).

Kako se se dobili zadovoljavajući rezultati analize, uzorak koji unosimo u sustav za analizu mora biti odgovarajuće veličine i unesen kao "čep" plina. Sporo injektiranje uzorka rezultira slabim razdvajanjem komponenata uzorka. Injektiranje uzorka se najčešće provodi uz pomoć mikrošprice za injektiranje plinskog ili tekućeg uzorka kroz silikonsku gumu u područje neposredno na početku kolone gdje dolazi do rasprskivanja i isparavanja uzorka. Temperatura prostora bi trebala biti veća za oko 50°C temperature vrelišta najslabije hlapive komponente u uzorku kako bi isparavanje bilo potpuno (Primorac, 2007.).

Plin nosač ili mobilna faza služi za prijenos uzorka kroz kolonu. Koriste se nereaktivni inertni plinovi poput dušika, vodika, helija ili argona. Analiza počinje unosom male količine uzorka u injektor koji potom raspline uzorak i pomiješa ga s MF na početku kolone. Mobilna faza s odijeljenim analitom na kraju kolone prolazi kroz detektor koji prevodi detektirane promjene u električni signal koji se ispisuje kao kromatogram.

U plinskoj kromatografiji se koriste punjene ili kapilarne kolone. Kapilarne kolone su bolje od punjenih jer provode bolje odjeljivanje, analiza je brža i zahtjevaju manje uzroka (Blažević, 2016.).

2.5.2. Spektrometrija masa

Instrumente koje daju podatke o molekularnoj strukturi nazivamo spektrometri. Razlikujemo ih nekoliko, a to su infracrveni spektar, ultraljubičasti spektar, spektar nuklearne – magnetske rezonancije, spektar masa i spektar elektron – spinske rezonancije.

Spektrometar masa je uređaj u kojem se molekule bombardiraju snopom elektrona bogatih energijom. Molekule se ioniziraju i svaka vrsta iona ima određenu masu i naboj. Za većinu iona naboj iznosi $e = -1$, te m/e predstavlja masu iona. Niz iona se analizira na način da se dobije signal za svaku vrijednost m/e koja je prisutna. Intenzitet pojedinog signala pokazuje relativnu količinu iona koju daje taj signal.

Spektar masa je dijagram koji pokazuje relativne intenzitete signala na različite vrijednosti m/e . Uz njega se može odrediti struktura nepoznatog spoja preko molekularne formule ili molekularne težine (Vrdoljak, 2003.).

Obzirom da spektri nastaju na različit način, spektrometri se poprilično razlikuju u izvedbi i stupnju složenosti.

Sastavni dijelovi spektrometra su (**Slika 12**): izvor zračenja, selektor valnih duljina, kiveta za uzorak, pretvornik zračenja, sustav za očitavanje signala (detektor), procesor signala (računalo) i pisac (Web 3).



Slika 12 Spektrofotometar (Web 3)

2.5.3. SPME analiza

SPME (eng. *Solid phase microextraction*) tehnika se sastoji od dvije odvojene faze, a to su apsorpcija i desorpcija. Apsorpcija predstavlja zaostajanje analita na stacionarnoj fazi, a na desorpciju utječu vrijeme desorpcije i temperatura. Faktori koji utječu na ekstrakciju su tip uzorka, pH uzorka, ionska jakost, vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije i mućkanje uzorka (Vrdoljak, 2003.).

Plinsko–kromatografska metoda uz uporabu plinskog kromatografa s maseno-selektivnim detektorom (GC-MS) se primjenjuje da bi se potvrdili pojedinačni aromatični sastojci na osnovi usporedbe spektra pojedinog sastojka iz vina sa spektrom iz baze podataka. Uvjeti rada su jednaki uvjetima plinskog kromatografa s masenim detektorom (Pozderović i sur., 2010.).

SPME uzorkovanje je jednofazan proces, a sama tehnika je vrlo osjetljiva pa treba posebnu pažnju posvetiti temperaturi apsorpcije i vremenu apsorpcije kako bi oni ostali konstantni.

Za brže postizanje ravnoteže između vodene i plinovite faze provodi se konstantno miješanje vodenih uzoraka u cilju kontinuiranog postizanja svježije površine (Vrdoljak, 2003.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada je ispitati utjecaj ranije zaustavljene alkoholne fermentacije i ostatka neprevrelog šećera na zadržavanje tvari arome i boje u vinu sorte Graševina. Alkoholna fermentacija bit će prekinuta kada se moštnom vagom odredi sadržaj šećera od 29-30°Oe. Nakon toga će se u navedenom vinu odrediti sadržaj tvari boje, polifenoli, flavonoidi i antioksidacijska aktivnost upotrebom spektrofotometra. Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka provest će se primjenom instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). Za ovo istraživanje korišten je plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A. Dobiveni rezultati usporedit će se s rezultatima uzorka vina sorte Graševina bez ranije zaustavljene alkoholne fermentacije.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Karakteristike vina Graševina

Graševina je bijela sorta vina za koju se pretpostavlja da potječe iz srednje Europe, ali mnogi ju danas smatraju autohtonom sortom. U Hrvatskoj predstavlja jednu od najpopularnijih bijelih sorti. Vino graševine je žućkaste boje, izraženog mirisa, ugodno gorkasto i suho. Sortni miris i aromu istaknute svježnine razvija već kao mlado vino (Web 5). Najveći broj kvalitetnih vina graševine proizvodi se u podregiji Slavonija, puno manje u podregijama Plešivica, Zagorje-Međimurje, Prigorje-Bilogora, Moslavina i Podunavlje (Web 6).

Mnogi osjete note svježeg voća poput jabuke i kruške, a od cvjetinih nota posjeduje svojstva ljubice, jasmína i lipe. Za okus je uobičajena i blaga gorčina na završetku što predstavlja vrlo cijenjenu karakteristiku (Web 7).

Tablica 1 Karakteristike analiziranog vina Graševine

Vinogradska regija:	Kontinentalna Hrvatska
Podregija:	Podunavlje
Vinogorje:	Erdutsko
Sorta:	Graševina
Godina berbe:	2008.

3.2.2. Kemijska analiza vina

Određivanje SO₂

Slobodni SO₂ određivan je titracijskom metodom pomoću otopine joda, uz škrob kao indikator. Analiza je provedena na sobnoj temperaturi. Dodavanjem sumporne kiseline, SO₂ se oslobađa iz sulfita, a zatim se oksidira djelovanjem joda koji se reducira. Na osnovu utroška joda za titraciju, izračuna se količina slobodnog SO₂.

Ukupni SO₂ određivan je istim postupkom, ali je vino prethodno tretirano s NaOH čime se stvara alkalna sredina u kojoj se oslobađa SO₂ (vezan na šećere, aldehide i polifenolne tvari). Titracija se vrši do pojave konstante plave boje u oba slučaja, te je i račun jednak.

Račun : $SO_2 \text{ (mg/dm}^3\text{)} = V \text{ (0,02 N I}_2\text{) (cm}^3\text{)} \cdot 12,8$

Određivanje reducirajućih šećera

Filtrat: uzorak vina (25 g), CaCO₃ (slabo kisela reakcija), reagens I (vodena otopina kalijferocijanida) i reagens II (vodena otopina cinkovog acetata), destilirana voda.

Rad sa uzorkom: U tikvicu se odmjeri Luffova otopina i doda filtrat, te destilirana voda.

Sadržaj se zagrijava tako da provri i umjereno vrenje se nastavi 10 minuta. Potom se sadržaj naglo hladi i dodaje se otopina KI, te H₂SO₄ i otopina KCNS. Istaloženi jod se titrira otopinom

Natiosulfata, uz dodatak škroba kao indikatora, dok se ne izgubi plava boja (usporedba sa slijepom probom).

Račun: % red.šeć. = $(a \cdot 100) / \text{mg uzorka}$

a – šećer (mg) izračunat dobivenim rezultatima prema tablici po Luff-Schoorl-u.

Određivanje ukupnih kiselina

Princip ove metode zasniva se na neutralizaciji svih kiselina (nakon uklanjanja CO_2) s NaOH, uz indikator do promjene boje. Ukupne kiseline izražene su kao vinska kiselina.

Račun: *vinska kiselina* (g/dm^3) = $V (0,25 \text{ N NaOH}) (\text{cm}^3) \cdot 0,75$

Određivanje ukupnog ekstrakta i alkohola

Provedena je destilacija uzorka vina (100 mL). Suhi ostatak ili ekstrakt je cjelokupna količina onih tvari koje zagrijavanjem na 100 °C (destilacija) ne prijeđu u destilat. Mjeri se uz pomoć piknometara. Prvo se izračuna relativna gustoća ekstrakta.

Račun: $\Upsilon (\text{ekstrakta}) = \frac{Q_1 - Q}{Q_2 - Q} \cdot K$

Υ – relativna gustoca ekstrakta

Q – masa praznog piknometra

Q1 – masa piknometra sa ekstraktom

Q2 – masa piknometra sa destiliranom vodom

K – faktor korekcije = 0,99823

Iz izračunate gustoće ekstrakta iz Tablice za preračunavanje očitava se količina ekstrakta

izražena u g/L. Ekstrakt bez šećera izračunat je matematički:

Ekstrakt bez šecera (g/L) = *Ekstrakt* (g/L) – *količina šecera* (g/L)

Količina alkohola mjeri se preko destilata koji je dobiven ovom istom destilacijom. Formula je jednaka, a udio alkohola (vol. %) očitava se iz Tablice za preračunavanje g alkohola u litri na volumne postotke.

$$\text{Račun: } Y (\text{destilata}) = \frac{Q_1 - Q}{Q_2 - Q} * K$$

Određivanje pepela

Određivan je ostatak koji je ostao nakon potpunog spaljivanja uzorka vina. U porculanskoj zdjelici na vodenoj kupelji (120°C) isparavan je uzorak vina (25 mL), zatim sušen u sušioniku na 120°C 1 sat i potom spaljivan u mufolnoj peći na temperaturi od 200 - 500°C do potpunog spaljivanja.

$$\text{Račun: } m \text{ pepela (g/25 cm}^3 \text{ vina)} = m_2 - m_1$$

$$m \text{ pepela (g/L)} = m \text{ pepela (g/25 cm}^3 \text{ vina)} \cdot 40$$

m_1 - masa prazne porculanske zdjelice (g)

m_2 - masa porculanske zdjelice sa pepelom (g)

Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva

Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Folin-Ciocalteu metoda temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbance) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988.). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Folin-Ciocalteu reagens (1:10) pripremljen je tako da je otpipetirano 3,3 ml Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 ml i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom. Otpipetirano je 0,2 ml uzorka soka određenog razrijeđenja, te dodano 1,8 ml destilirane vode, 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 ml 7,5 % Na_2CO_3 (ukupni volumen mora biti 20 ml). Za slijepu probu otpipetira se 2 ml destilirane vode u epruvetu, te doda 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 8 ml 7,5 % Na_2CO_3 . Nakon stajanja u mračnom prostoru 2-20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se

apsorbanca na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida učinjeno je prema metodi Kim, Jeong i Lee (2003.) s modifikacijom (Blasa i sur., 2005.). Za kalibraciju su uzete različite koncentracije kvercetina (5-114 µg/mL), a linearnost je 0,9953 (R^2). Postupak određivanja vršio se tako što je 1 mL otopine vina (1 mg/mL) pomiješan s 0,3 ml NaNO_2 (5%), a nakon 5 min je dodano 0,3 ml AlCl_3 (10%). Uzorci su pomiješani te su nakon 6 minuta neutralizirani s 2 ml otopine NaOH (1M). Absorbanca je izmjerena za sve uzorke pri 510 nm, a kvantifikacija izvedena koristeći kalibracijsku krivulju. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata kvercetina (QE)/100 g vina, kao srednja vrijednost triju ponavljanja.

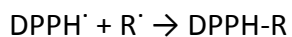
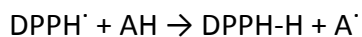
Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa u hrani je uklanjanje radikala. Voće i povrće, kao jedna od važnijih komponenti uravnotežene prehrane, glavni su izvor antioksidanasa potrebnih ljudskom organizmu.

Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidacijske aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. One koje su najčešće, koriste 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2, 2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS) radikale.

Antioksidacijska aktivnost je određivana primjenom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reagensa. Kod DPPH testa, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem absorbancije na 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa (AH) ili reakcije s radikalima (R').

Prva reakcija s DPPH radikalima odvija se s nekom od fenolnih tvari, ali spora sekundarna reakcija može izazvati progresivno smanjenje absorbance, te se ravnotežno stanje ne može postići nekoliko sati.



Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenjena je metoda po Shimadu i sur. (1992.) s malim modifikacijama (Shimada i sur., 1992.). U kivetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH. Reakcijska smjesa je ostavljena stajati 15 minuta te je absorbancija mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini od 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol.

Antioksidacijska aktivnost je izračunata prema slijedećem izrazu:

$$aa(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) * 100$$

gdje je:

A_0 – absorbancija slijepe probe

A_1 – absorbancija uzorka.

3.2.3. Analiza arome vina plinskom kromatografijom primjenom SPME analize

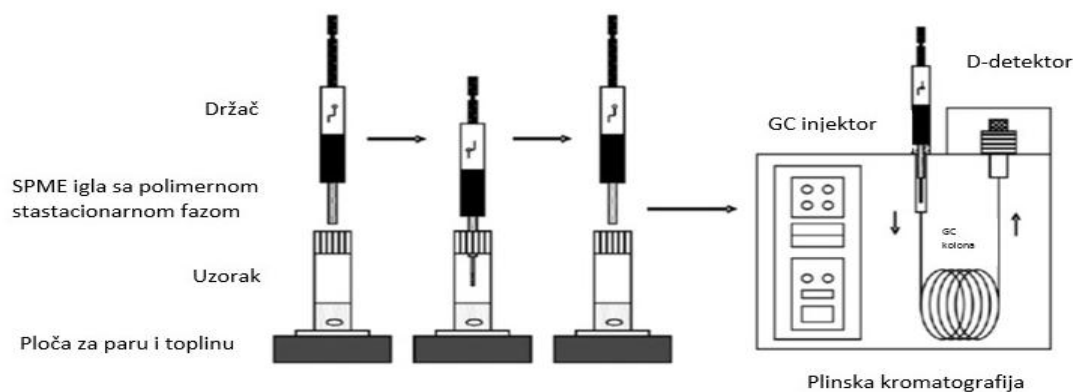
Priprema uzoraka za analizu:

Tehnika korištena prilikom pripreme uzorka je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) za koju je neophodna SPME aparatura. Osnova SPME aparature je igla unutar koje se na polimernu stacionarnu fazu adsorbiraju aromatični sastojci. U radu je za pripremu uzoraka korišteno punilo od polidimetilsiloksana-divinilbenzena (polimerna stacionarna faza) debljine 65 μm .

Postupak pripreme uzorka:

U bočicu od 10 mL odvaže se 5 g uzorka vina. Kako bi adsorpcija aromatičnih sastojaka bila bolja dodaje se 1 g NaCl. U bočicu se ubaci magnet, te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u vodenu kupelj, te se uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, aromatični sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu unutar igle. Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 5 minuta miješa na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40 °C (vodena kupelj) u trajanju od 45 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija (**Slika 13**).

Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka vina provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. Prilikom izrade ovog rada korišten je plinski kromatograf tvrtke Agilent 7890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5977 A.



Slika 13 Korištenje SPME držača za uzorkovanje i analizu

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

Parametri ekstrakcije:

- Temperatura ekstrakcije: 40 °C
- Vrijeme ekstrakcije: 45 minuta
- Tip mikroekstrakcijske igle: 65 µm PDMS/DVB (Supelco).

GC-MS analitički uvjeti:

Kolona: HP5; 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent)

- Početna temperatura: 40 °C (2 minuta)
- Temperaturni gradijent: 6 °C/min

Plin nosač: helij (čistoće 5,0) s protokom 1 mL/min pri 40 °C

- Konačna temperatura: 230 °C
- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Desorpcija uzorka u injektor: 7 min

U izradi kromatografske analize korišten je splitlessmod.

4.REZULTATI

Tablični prikazi rezultata

Tablica 2 Kemijska analiza suhog i polusuhog vina sorte Graševina

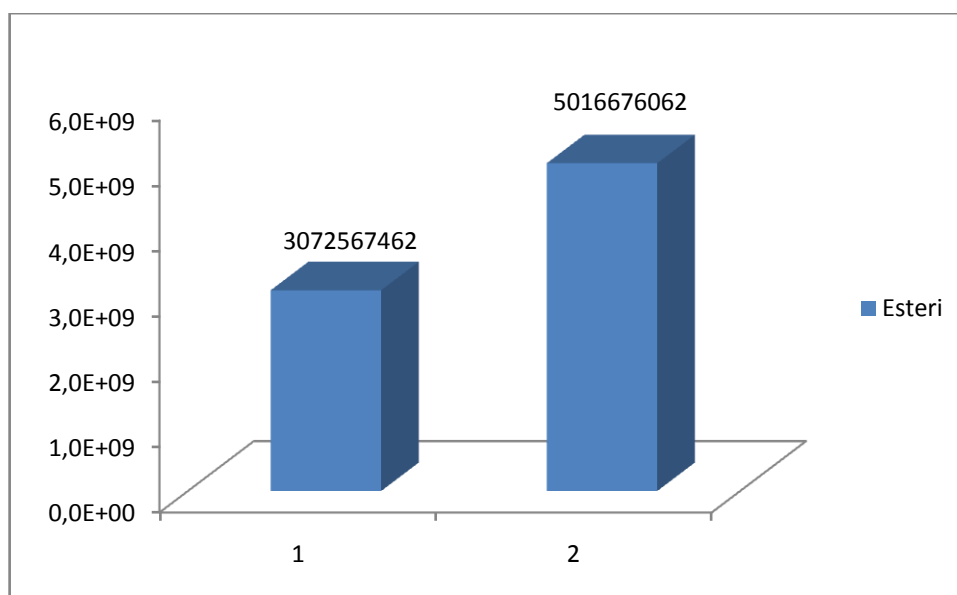
	Graševina (suha)	Graševina (polusuha)
Udio suhe tvari (%)	7	11
Ukupne kiseline (g/L)	7,200	5,288
Slobodni sumpor (mg/L)	26,24	56,64
Ukupni sumpor (mg/L)	99,84	419,84
Pepeo (g/L)	3,136	9,300
Prirodni šećeri (g/L)	0,89	30,16
Alkohol (vol. %)	11,98	13,65
Ekstrakt (g/L)	25,5	62,20

Tablica 3 Tvari boje u ispitivanom suhom i polusuhom vinu sorte Graševina

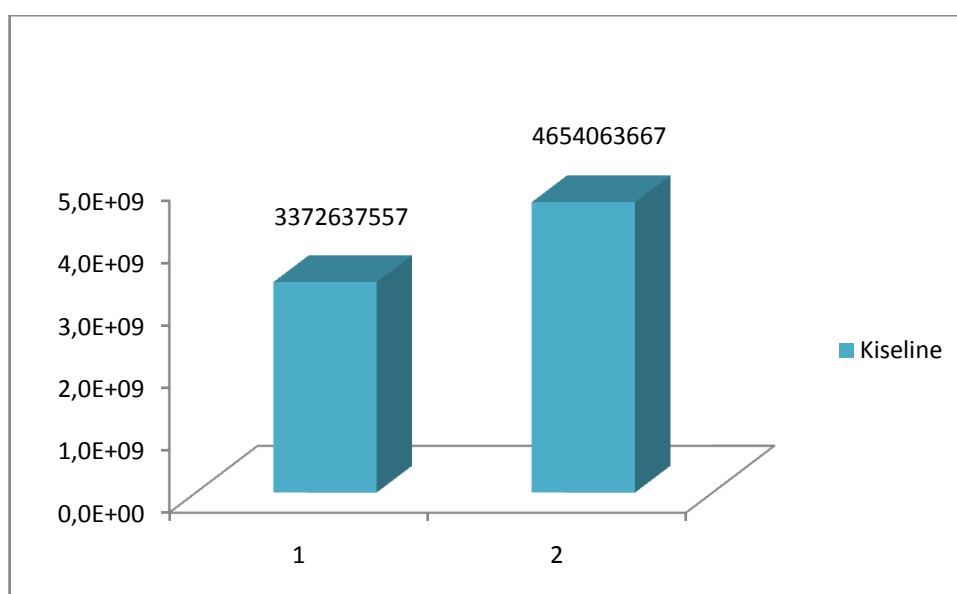
	Graševina (suha)	Graševina (polusuha)
Antioksidacijska aktivnost (mg/100 g)	11,72	3,19
Flavonoidi (mg/L)	156,28	54,07
Polifenoli (mg/L)	533,65	471,93

Tablica 4 Retencijska vremena aromatičnih spojeva identificiranih u ispitivanim uzorcima vina sorte Graševina

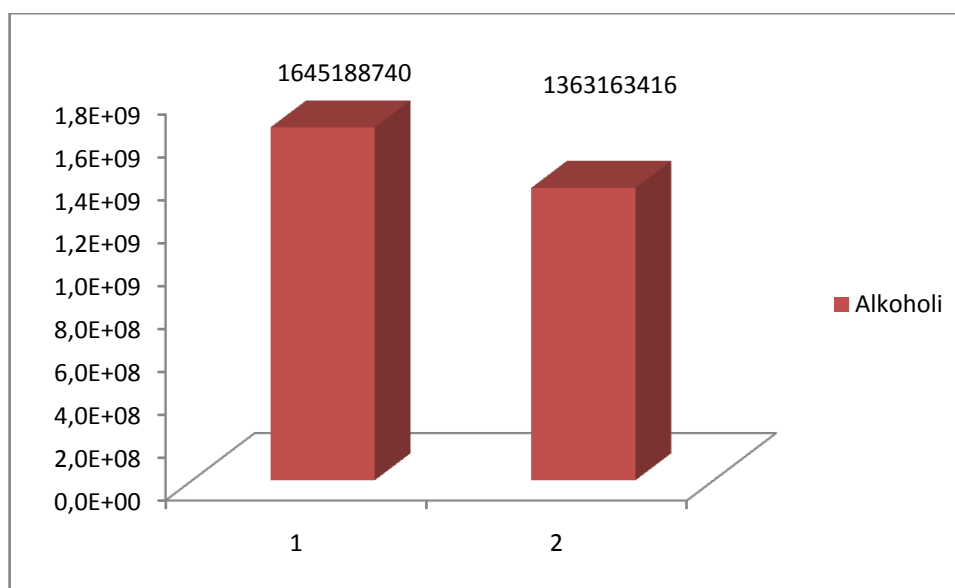
Sastojak	RT (vrijeme pojavnosti pika na kromatogramu)
Esteri	
Etil acetat	3,394
3-metilbutil acetat	8,916
Etilesterheksanske kiseline	12,595
Etilester oktanske kiseline	18,122
Etilesternonanske kiseline	20,007
Etilester dekanske kiseline	21,551
Kiseline	
Octena kiselina	18,472
Heksanska kiselina	24,231
Oktanska kiselina	26,531
Nonanska kiselina	27,509
Dekanska kiselina	29,463
Alkoholi	
3-metil-1-butanol	12,441
4-metil-1-pentanol	15,166
1-heksanol	16,264
3-heksen-1-ol	17,028
3-etil-4-metilpentanol	19,581
2,3-butandiol	20,087
1-nonanol	21,864
α -terpineol	22,411
Benzil alkohol	24,577
2-heptadekanol	25,625
Karbonilni spojevi	
Benzaldehid	19,771
Furfural	18,662
Tetradekanal	27,383
Terpenoidi	
α -jonon	19,893
α -murolen	22,771
Citronelol	23,228
Izopugenol	23,776
Geraniol	24,186



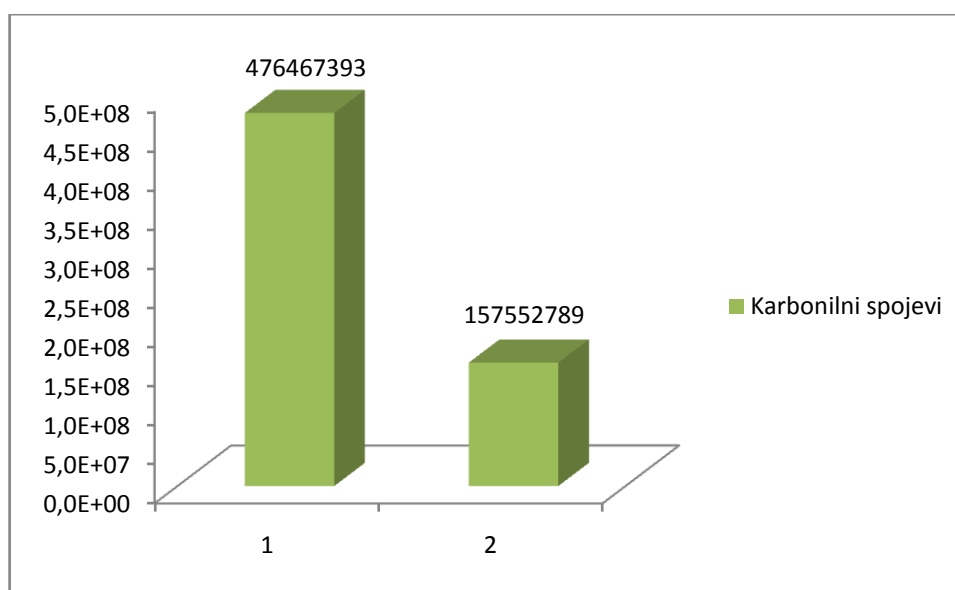
Slika 14 Sadržaj estera u vinu Graševina suha (1) i u vinu Graševina polusuha (2)



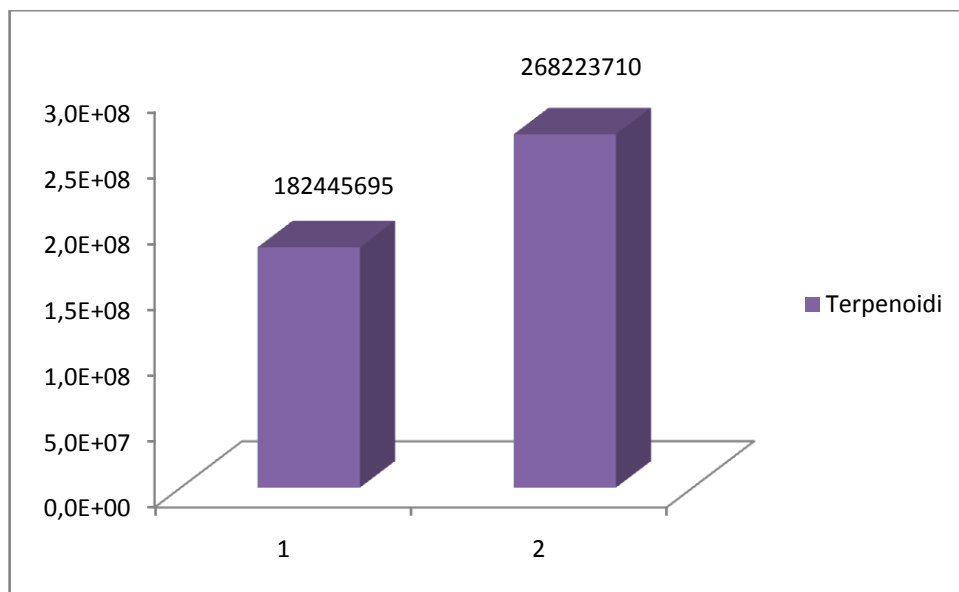
Slika 15 Sadržaj kiselina u vinu Graševina suha (1) i u vinu Graševina polusuha (2)



Slika 16 Sadržaj alkohola u vinu Graševina suha (1) i u vinu Graševina polusuha (2)



Slika 17 Sadržaj karbonilnih spojeva u vinu Graševina suha (1) i u vinu Graševina polusuha (2)



Slika 18 Sadržaj terpenoida u vinu Graševina suha (1) i u vinu Graševina polusuha (2)

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja utjecaja ranije zaustavljene alkoholne fermentacije na aromatski profil i boju vina sorte Graševina prikazani su u **Tablicama 2, 3 i 4** te na Slikama **14, 15, 16, 17 i 18**. **Tablica 2** prikazuje rezultate ispitivanja kemijskog sastava vina Graševine dobivene potpunom i ranije zaustavljenom alkoholnom fermentacijom.

Vina se klasificiraju prema kemijskim svojstvima koja uključuju alkoholnu jakost, kiselost, udjel šećera, količinu fenolnih tvari i suhi ekstrakt.

Glavne organske kiseline grožđa, mošta i vina su vinska, jabučna i limunska kiselina te one predstavljaju skoro 90% ukupne sume svih kiselina. Njihova koncentracija mijenja se tijekom razvoja bobice i dozrijevanja grožđa, a, osim o kultivaru, uvelike ovisi o položaju vinograda, stupnju zrelosti grožđa, vremenskim uvjetima tijekom dozrijevanja grožđa (godištu) te protjecanju alkoholne fermentacije. Ukupne kiseline su važne jer sudjeluju u formiranju osvježavajućeg okusa vina, a uz to posjeduju konzervirajuće djelovanje. Rezultati iz **Tablice 2** pokazuju da više ukupnih kiselina ima vino dobiveno potpunom alkoholnom fermentacijom u odnosu na vino s ranije zaustavljenom fermentacijom.

Jedan od najboljih pokazatelja zrelosti grožđa su šećeri. Grožđe sadrži oko 15-25% glukoze i fruktoze koji se tijekom fermentacije uglavnom pretvaraju u alkohol. U suhim vinima šećeri se uglavnom nalaze u tragovima (0,1%), dok u slatkim mogu biti i preko 10 %. Međutim, slatkoća vina ne potječe samo od šećera, već i od alkohola. Reducirajući šećeri su svi šećeri koji imaju aldehidnu ili keto funkcionalnu skupinu. Njihovo određivanje vezano je za redukciju alkalne otopine bakar (II) soli. Šećeri koji ne fermentiraju, već ostaju u vinu nazivaju se rezidualni šećeri. Iz **Tablice 2** vidljivo je da više šećera sadrži vino Graševine dobiveno ranije zaustavljenom alkoholnom fermentacijom u odnosu na potpuno fermentiranu Graševinu. Razlog tome je što ranije zaustavljenom fermentacijom zaostane veliki udio šećera u vinu.

Ukupni ekstrakt je znatno zastupljeniji u Graševini sa ranije zaustavljenom alkoholnom fermentacijom.

SO₂ (sumporni dioksid) je danas u vinarstvu praktično nezamjenljivo sredstvo. Njegovi pozitivni učinci daleko nadmašuju njegove mane, a neko drugo sredstvo sličnih osobina još uvijek nije nađeno. Nastaje bilo izgaranjem sumpornih traka, otapanjem kalijevog metabisulfita u vinu ili moštu ili direktnom primjenom iz boce ili otopine. Funkcije su mu

brojne, a one najčešće su zaštita od oksidacije i mikrobiološka stabilizacija vina. U vinu dolazi u slobodnom i vezanom obliku. Slobodni oblik je najbitniji za zaštitu vina. Dio slobodnog SO_2 se veže na razne organske spojeve (šećere, aldehide, piruvičnu kiselinu) i kao takav i ostaje. Ukupni SO_2 je zbroj slobodnog i vezanog SO_2 u vinu. Vrlo je bitno pratiti kretanje i koncentraciju slobodnog i vezanog SO_2 u vinu. Iz **Tablice 2** vidi se da je slobodni SO_2 puno zastupljeniji u vinu s ranije zaustavljenom alkoholnom fermentacijom.

U **Tablici 3** prikazan je sadržaj polifenola, flavonoida te antioksidacijska aktivnost ispitivanih vina sorte Graševina.

Fenolne tvari su značajne za izgled, okus i kakvoću vinate imaju zaštitnu ulogu u ljudskom organizmu. Udio fenola u vinu ovisi o količini prisutnoj u grožđu te o vremenu kontakta kožice i sjemenke grožđa sa sokom tijekom maceracije. O njihovom sadržaju ovisi gorčina i trpkost vina. **Tablica 3** prikazuje sadržaj tvari boje u ispitivanim vinima koji uključuje flavonoide, polifenole i antioksidacijsku aktivnost.

Tablica 3 pokazuje da potpuno fermentirana Graševina sadrži veće količine polifenola te veću antioksidacijsku aktivnost i udio flavonoida.

Aromu vina čine brojni spojevi različitih koncentracija, poput terpenoida, karbonilnih spojeva, estera, alkohola i drugih. Aroma ima važnu ulogu u kakvoći vina, dok su hlapljive komponente odgovorne za miris vina.

Tablica 4 pokazuje da je u ispitivanim vinima identificirano dvadeset i devet aromatičnih sastojaka koji su podijeljeni u pet skupina. To su esteri, kiseline, alkoholi, karbonilni spojevi i terpenoidi. Najvažnije arome bijelih vina nastaju tijekom fermentacije: etilni esteri koji daju voćnu i vinsku aromu, acetatni esteri koji su odgovorni za arome tropskog voća i banane te viši alkoholi koji su poželjni u ukupnoj aromi vina ako su zastupljeni u količini manjoj od 300 mg/L.

Na **Slici 14** prikazan je sadržaj estera u ispitivanim vinima. Vidljivo je da vino s ranije zaustavljenom alkoholnom fermentacijom sadrži veće količine estera.

Kiseline potječu iz samog grožđa, ali nastaju i fermentacijom. Iz **Slike 15** je vidljivo da vino dobiveno ranije zaustavljenom fermentacijom sadrži veće količine kiselina u usporedbi s potpuno fermentiranim vinom. Identificirano je pet kiselina, a to su octena, heksanska, oktanska, nonanska i dekanska.

Alkoholi su aromatični spojevi koji nastaju kao sekundarni produkti metabolizma kvasaca. U ispitivanim vinima je identificirano deset vrsta alkohola. **Slika 16** prikazuje da potpuno fermentirano vino sadrži veće količine alkohola u odnosu na vino ranije zaustavljene fermentacije.

Karbonilni spojevi pronađeni u ispitivanim vinima su benzaldehid, furfural i tetradekanal. Benzaldehid daje miris na marcipan, a furfural je zastupljen samo u potpuno fermentiranom vinu. Tetradekanal ukazuje na to da je vino odležavalo u drvenim bačvama. Iz **Slike 17** je vidljivo da potpuno fermentirano vino sadrži veće količine karbonilnih spojeva u usporedbi s Graševinom ranije zaustavljene fermentacije.

Terpeni su glavni nositelji primarnih ili sortnih aroma. U ispitivanim vinima su pronađeni α -jonon, α -murolen, citronelol, izopulegol i geraniol. Citronelol ostavlja cvjetni miris, dok geraniol daje mirisnu notu ruže. **Slika 18** prikazuje sadržaj terpenoida u ispitivanim vinima i iz nje je vidljivo da vino s ranije zaustavljenom alkoholnom fermentacijom sadrži veće količine terpena u odnosu na potpuno fermentirano vino.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Procesni parametri (temperatura i vrijeme), kao i tijek alkoholne fermentacije utječu na kemijski sastav ispitivanih vina sorte Graševina.
- Rezultati ispitivanja pokazali su razlike u sadržaju ispitivanih tvari boje među vinima, jer su ona proizvedena različitim tehnološkim postupkom. Bogatije polifenolima i flavonoidima bilo je vino dobiveno potpunom alkoholnom fermentacijom.
- Iz rezultata istraživanja vidljivo je da su u oba ispitivana vina nađene visokovrijedne hlapljive tvari arome.
- α -murolen zastupljen je u oba ispitivana vina, a koristan je u očuvanju zdravlja ljudi.
- Furfural je prisutan u potpuno fermentiranom vinu, dok ga u vinu s ranije zaustavljenom alkoholnom fermentacijom nema, jer se nisu u potpunosti razgradili šećeri pentoze.
- Oba ispitivana vina imala su zamjetan udio izopugenola. To im daje ulogu zdravog pripravka u primarnoj prevenciji zdravlja ljudi jer pomaže u borbi protiv upalnih procesa u organizmu, epilepsije i Alzheimerove bolesti.

7. LITERATURA

- Alpeza I: Temelji kemijskog sastava vina. Stručni rad. *Glasnik zaštite bilja*, 143-150, 2008.
- Andabaka Ž, Stupić D, Karloglan M, Marković Z, Preiner D, Maletić E, Karoglan Kontić J: Povijesni tijek uzgoja najvažnijih autohtonih dalmatinskih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.). *Glasnik zaštite bilja*, 14-20, 2016.
- Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini PM, Albertini MC, Piatti E: Raw Mille fiorihoney is packedfull of antioxidants. *Food Chemistry* 97: 217-222, 2005.
- Blažević M: Određivanje hlapivih komponenti pjenušavih, predikatnih i fortificiranih vina plinskom kromatografijom. *Završni rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2016.
- Cracknell HL, Nobis G: Wine production and wine-making countries. *The new catering repertoire*, str. 289-336. Palgrave, London, 1990.
- Džolan A : Proteini u vinu. *Završni rad*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2012.
- Grgić M: Procesi fermentacija u proizvodnji bijelih vina. *Diplomski rad*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2015.
- Hrvatski sabor: *Zakon o vinu*: Broj: 01-081-03-2098/2, Zagreb, 2003.
- Ivandija T: Autohtone vinske sorte. *Glasnik zaštite bilja*, 117-125, 2008.
- Kim DO, Jeong SW, Lee CY: Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81: 321–326, 2003.
- Maletić E, Karoglan Kontić J, Pejić I, Preiner, Zdunić G, Bubola M, Stupić D, Andabaka Ž, Marković Z, Šimon S, Mihaljević Žulj M, Ilijaš I, Marković D: *Hrvatske izvorne sorte vinove loze*. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 2015.
- Ough CS, Amerine MA: *Phenolic Compounds. Methods for Analysis of Musts and Wines*. (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons Inc., str. 196-221, 1988.
- Pichler A: Osnove tehnologije vina. *Nastavni materijali*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2017.
- Pozderović A: *Tehnologija prerade sirovina biljnog podrijetla II – Osnove tehnologije vina*. Skripta za vježbe. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, 2013.
- Pozderović A, Pichler A, Paragović K, Moslavac T: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vine sorte graševina. *Glasnik zaštite bilja*, 74-82, 2010.
- Prce V: Sadržaj antocijana, polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost u crnim vinima Slovačkih vinogorja. *Diplomski rad*, 2014.

Primorac Lj: *Kontrola kakvoće hrane*. Interna skripta, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2007.

Shimada K, Fujikawa K, Yahara, Nakamura T: Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 945–948, 1992.

Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte Graševina. *Diplomski rad*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2009.

Zoričić M: *Podrumarstvo*, Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1997.

Web izvori:

WEB 1

https://www.veleri.hr/files/datotekep/nastavni_materijali/k_vinarstvo_1/3%20-%20Vinifikacija%20sa%20pre%C5%A1ama.pdf, pristupljeno 16.9.2017.

WEB2

[https://www.google.hr/search?q=pre%C5%A1a+za+gro%C5%BE%C4%91e&tbm=isch&imgil=E0rGCUFtV2fCSM%253A%253BwqdyoFA511w2YM%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fwww.njuskalo.hr%25252Fsjetva-zetva-berba%25252Fhidraulicna-presa-grozde-oglas-9054164&source=iu&pf=m&fir=E0rGCUFtV2fCSM%253A%252CwqdyoFA511w2YM%252C&usq=DWCnXWlzoGiuPuZxrbmHyT01Ujs%3D&biw=1366&bih=638&ved=0ahUKEwiit_L27KnWAhWDwxQKHf-eBDcQyicLPw&ei=aCy9WaLjGoOHU_-9krqD#imgsrc=YwjAxB95IMydeM](https://www.google.hr/search?q=pre%C5%A1a+za+gro%C5%BE%C4%91e&tbm=isch&imgil=E0rGCUFtV2fCSM%253A%253BwqdyoFA511w2YM%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fwww.njuskalo.hr%25252Fsjetva-zetva-berba%25252Fhidraulicna-presa-grozde-oglas-9054164&source=iu&pf=m&fir=E0rGCUFtV2fCSM%253A%252CwqdyoFA511w2YM%252C&usq=DWCnXWlzoGiuPuZxrbmHyT01Ujs%3D&biw=1366&bih=638&ved=0ahUKEwiit_L27KnWAhWDwxQKHf-eBDcQyicLPw&ei=aCy9WaLjGoOHU_-9krqD#imgsrc=YwjAxB95IMydeM;);, pristupljeno 16.9.2017.

WEB 3

<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=57379>, pristupljeno 18.9.2017.

WEB4

[https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dna+mulja%C4%8Da+grifo&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjE3q3At6XWAhVJXR0KHej-DokQ_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgsrc=gwRwXTayRUaBrM](https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dna+mulja%C4%8Da+grifo&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjE3q3At6XWAhVJXR0KHej-DokQ_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgsrc=gwRwXTayRUaBrM;);, pristupljeno 17.9.2017.

WEB 5

<https://hr.wikipedia.org/wiki/Gra%C5%A1evina>;, pristupljeno 23.9.2017.

WEB 6

<http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=gra%C5%A1evina>, pristupljeno 25.9.2017.

WEB 7

<http://ordinacija.vecernji.hr/zdravi-tanjur/jedi-zdravo/znate-li-sve-o-grasevini/>, pristupljeno 26.9.2017.